



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11) EP 0 823 633 A1

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:
11.02.1998 Patentblatt 1998/07

(51) Int. Cl.⁶ G01N 33/48, G01N 15/04,
G01N 21/64, G01N 33/533,
G01N 33/536, G01N 33/569,
B04B 5/04

(21) Anmeldenummer: 97112928.3

(22) Anmeldetag: 28.07.1997

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU MC
NL PT SE

(71) Anmelder: Komanns, Aribert, Dr.
50129 Berghelm (DE)

(30) Priorität: 07.08.1996 DE 19631855

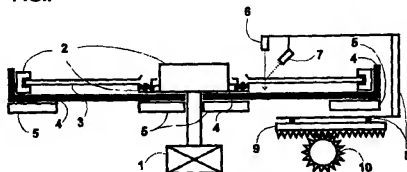
(72) Erfinder: Komanns, Aribert, Dr.
50129 Berghelm (DE)

(54) Verfahren zur Erfassung von Oberflächenantigenen oder Strukturmerkmalen von Zellen, Partikeln oder Makromolekülen

(57) Werden Zellen, Partikel oder Makromoleküle mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern oder Liganden fluoreszenzmarkiert und in lichtdurchlässigen Reaktionsgefäßen einem flüssigen oder gelartigen Medium aufgeschichtet und zentrifugiert, so kommt es zu einer Sedimentation und/oder Auftrennung der Bestandteile im Medium. Gegenüber einer Lichtquelle (6) mit fluoreszenz-anregendem Spektrum entstehen Fluoreszenzbandenmuster, die visuell erfaßt oder mittels Scanner oder CCD-Sensor registriert werden. Alternativ kann während der Zentrifugation eine orts- und/oder zeitauflösende Fluoreszenzmessung durch Zentrifugalanalyse erfolgen. Dabei erzeugt eine stationäre oder radial

bewegliche Optik (6,7,8) einen punktförmigen monochromatischen Anregungsstrahl, der beim Auftreffen auf fluoreszenzmarkierte Bestandteile im Medium eine Fluoreszenzemission erzeugt, die durch einen Fluoreszenzdetektor (7) erfaßt wird, der auf den jeweiligen Anregungsort im Medium fokussiert ist. Dabei ist gewährleistet, daß während der Zentrifugation jeweils innerhalb einer Rotorumdrehung die Fluoreszenzintensität in allen lichtdurchlässigen Reaktionsgefäßen (3) erfaßt wird. Die Steuerung übernimmt eine Zentraleinheit.

FIG.1



EP 0 823 633 A1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Erfassung von Oberflächenantigenen oder Strukturmarkern von Zellen, Partikeln oder Makromolekülen.

Werden Vollblut, Leukozytenkonzentrat, mononukleäre Zellen (nach Dichtegradientenzentrifugation aus Vollblut), plättchenreiches Plasma, subzelluläre Partikel oder Makromoleküle (DNA, RNA) mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern oder Liganden inkubiert, die spezifisch gegen Oberflächenantigene oder Strukturmerkmale dieser Bestandteile gerichtet sind, so binden die fluoreszenzmarkierten Antikörper oder Liganden sich spezifisch an korrespondierende Oberflächenantigene oder Strukturmerkmale dieser Bestandteile. Dabei kann bei Bedarf eine Mehrfachmarkierung vorgenommen werden, z.B. indem man Antikörper oder Liganden unterschiedlicher Spezifität mit verschiedenen Fluorochromen koppelt, die bei Anregung Fluoreszenzlicht unterschiedlicher Wellenlängen erzeugen. Wird ein derartiger Reaktionsansatz in lichtdurchlässigen Reaktionsgefäßen einem flüssigen oder gelartigen Medium (z.B. aus Mikrogelkugeln, Latexpartikeln, Dextran oder Zellulose) aufgeschichtet und anschließend zentrifugiert, so sedimentieren die Bestandteile im Medium gemäß ihren unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften und gemäß der Porengröße im Gel unterschiedlich schnell, sodaß sich idealerweise eine bandenartige Auftrennung der Bestandteile abzeichnet. Die verschiedenen Banden repräsentieren z.B. unterschiedliche Zellen, die mit Ausnahme der roten Zellen keine Eigenfarbe besitzen und somit bei Tageslicht nicht sichtbar sind. Durch die spezifische Markierung von Oberflächenantigenen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern können alle Banden mit fluoreszenzmarkierten Bestandteilen (Zellen) gegenüber einer Lichtquelle mit fluoreszenzanregendem Spektrum sichtbar gemacht werden. Die Ablesung der Fluoreszenzbanden kann nach Abschluß der Zentrifugation visuell oder maschinell erfolgen. Dabei können die lichtdurchlässigen Reaktionsgefäße über einen Scanner mit einer beweglichen Optik, die einen punktförmigen monochromatischen Anregungsstrahl erzeugt und einen Fluoreszenzdetektor, der auf den jeweiligen Anregungsort im Reaktionsgefäß fokussiert ist, abgescannert werden. Die Fluoreszenzintensität über den Reaktionsgefäßen wird ortsaufösend erfaßt. Alternativ kann das Fluoreszenzmuster mit dem CCD-Sensor einer Kamera erfaßt werden und über ein nachgeschaltetes Computerprogramm ausgewertet werden. Eine weitere Detektionsmöglichkeit ist über eine Zentrifugalanalyse möglich. Dabei werden die Fluoreszenzintensitäten über den Reaktionsgefäßen, die in radlärer Anordnung auf einem Rotor angeordnet sind, mittels einer stationären oder radlär beweglichen Optik während der Zentrifugation orts- und/oder zeitaufgelöst registriert. Die Optik erzeugt dabei einen punktförmigen monochroma-

tischen Anregungsstrahl, der auf das Medium innerhalb der lichtdurchlässigen Reaktionsgefäße ausgerichtet ist. Trifft der Strahl auf fluoreszenzmarkierte Bestandteile, wird eine ungerichtete Fluoreszenzstrahlung erzeugt, die durch einen Fluoreszenzdetektor erfaßt wird, der auf den jeweiligen Anregungsort im Reaktionsgefäß fokussiert ist. Bei der Zentrifugalanalyse, die ein bekanntes Rationalisierungsprinzip darstellt, können mehrere Messungen zeitgleich erfolgen und ausgewertet werden.

Aus EP 0194212 B1 ist ein Verfahren zum Nachweis einer Erythrozyten-Agglutination bekannt, bei dem eine Mischung von Serum und roten Blutkörperchen nach einer Inkubation in ein Gelmilieu gegeben wird, das antikörperhaltig oder antikörperfrei ist. Diese Mischung wird im weiteren Verlauf Sedimentationsbedingungen unterworfen, die eine Trennung von Serum und roten Blutkörperchen gewährleisten, einen Kontakt von Blutzellen und Antikörpern im Gel ermöglichen und agglutinierte Erythrozyten zurückhalten, während nicht agglutinierte Erythrozyten im Gel sedimentieren. Aufgrund der Eigenfarbe der Erythrozyten wird das unterschiedliche Sedimentationsverhalten von isolierten Erythrozyten und Agglutinatn visuell abgelesen. Die Agglutination beruht auf einer Antigen-Antikörperreaktion, die zu einer Vernetzung der beteiligten Zellen führt mit Ausbildung größerer Agglutinate, die das Gel nicht passieren können. Diese Methode findet in der Blutgruppenserologie Anwendung.

Zur Bestimmung der Antigenität von Blutzellen mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper ist das Verfahren der Durchflußzytometrie etabliert. Hierbei durchströmen markierte Zellen hintereinander eine dünne Kapillare, die zentral von einem Laserstrahl durchleuchtet wird. Passiert eine Zelle den Laserstrahl entstehen Streulicht- und Fluoreszenzimpulse, die über Detektoren erfaßt werden. Die Streulichtimpulse ermöglichen eine Zuordnung der Zellart. Die Fluoreszenzimpulse, die durch Bindung spezifischer fluoreszenzmarkierter Antikörper entstehen, erlauben den Nachweis von Oberflächenantigenen der Zelle. Das Verfahren der Durchflußzytometrie hat sich u.a. bei der Immunphänotypisierung der Leukämien, der HLA-Typisierung vor Transplantationen, dem CD34-Monitoring im Rahmen der Blutstammzellseparation und der Bestimmung von Thrombozytenantigenen bewährt.

Das Verfahren der Zentrifugalanalyse wurde von Norman G. Anderson bereits in den sechziger Jahren in *Analytical Biochemistry*, Vol. 23, 207-218 (1968) unter dem Titel "Analytical Techniques for Cell Fractions" und in *Science*, Vol. 166, 317-324, (1969) unter dem Titel "Computer Interfaced Fast Analyzers" beschrieben. Bei der Zentrifugalanalyse werden Untersuchungsmaterial und Reagenzien primär in getrennte Kammern eines Küvettenrotorsystems gebracht. Anschließend werden sie durch Anzentrifugieren in der Meßkammer des Küvettenrotorsystems zusammengeführt. Die Messung der Lichttransmission im Reaktionsansatz erfolgt in der

Art, daß jeweils innerhalb einer Rotorumdrehung die Lichttransmissionswerte aller Meßkammern photometrisch registriert werden. Somit wird insbesondere durch die Zentrifugalanalyse ermöglicht, eine erhebliche Anzahl von gleichen Untersuchungen parallel nebeneinander her ablaufen zu lassen.

In vielen folgenden Patentanmeldungen, z.B. US 41 35883, US 3713775, DE 3044385 A1, DE 3314961 A1 wurde im Zuge der Weiterentwicklung dieses Analysenprinzips die Form der Rotoren immer komplizierter gestaltet oder die Rotorimperierung wurde weitestgehend optimiert. In US 3713775 wurde zudem der Einsatz von Vollblut im Sinne einer weiteren Automatisierung vorgesehen. Dabei findet in einer integrierten Zentrifuge eine Fraktionierung der zellulären Bestandteile und des Serums statt.

In US 5 525 240 wird eine Vorrichtung und ein Verfahren offenbart, bei dem die Zentrifugation eines flüssigen Gemisches in einem Zentrifugenröhrchen in der Absicht erfolgt, Komponenten des flüssigen Gemisches mit unterschiedlicher Sedimentationsrate zu separieren. Dazu wird das Gemisch vorab mit Testpartikel versetzt, die fluoreszenzmarkiert sind und die in etwa das gleiche Sedimentationsverhalten aufweisen, wie die eigentlich interessierenden Bestandteile des Gemisches. Die Sedimentation der Testpartikel wird während der Zentrifugation verfolgt über ein Laser-Array mit korrespondierenden Photodektoren, die in fester radiallyer Ausrichtung das Zentrifugenröhrchen mit dem Gemisch während der Zentrifugation umgeben. Auf die Weise kann eine Detektion des Sedimentationsverhaltens der Testpartikel im Röhrchen stattfinden. Die Zentrifugengeschwindigkeit und Zentrifugationsdauer wird in Abhängigkeit des Sedimentationsverhaltens der Testpartikel gesteuert, sodaß insgesamt eine optimale Separation der interessierenden Bestandteile erzielt wird.

In US 3 679 367 wird eine Vorrichtung zur Messung des Partikelanteils (Packed Volume) am Gesamtvolumen eines flüssigen Gemisches offenbart. Dabei werden z.B. Blutproben über eine spezielle axiale Einführungs Vorrichtung nacheinander in ein kontinuierlich laufendes Zentrifugensystem geladen. Im Zentrifugenrotor werden die Blutproben unter der Einwirkung der Zentrifugalkraft in eine peripher lokalisierte Kapillarkammer befördert. Diese ist offenkundig und hat eine serpentinenartige radially ausgerichtete Konfiguration, d.h. die Kapillare läuft in sich zurück und bildet peripher eine Auffangschleife aus. Dadurch wird erzielt, daß ein fixes Volumen der zugeführten Blutprobe in der Schleife retiniert wird. In der Folge tritt unter der Einwirkung der Zentrifugalkraft eine Sedimentation der festen Bestandteile der Blutprobe ein. Über eine Optik mit einer Lichtquelle und einem Lichtsensor, die in Höhe der Kapillarschleife zu beiden Seiten des Zentrifugenrotors angebracht sind, wird der Sedimentationsvorgang abgescannt. Dabei ist in den Strahlengang ein über einen Motor drehbarer Spiegel

angebracht, der eine Ablenkung des Lichtstrahles über die volle Länge der Kapillarschleife ermöglicht. Eine nachgeschaltete Elektronik gewährleistet die Auswertung der Sedimentationsergebnisse und die Errechnung des "Packed volume".

Aus DE 4041554 C2 ist ein Verfahren zur Zentrifugalanalyse bekannt, bei dem die Sedimentationskinetik von Blutzellen, Hämagglutinaten und Antigen-Antikörperkomplexen unter Einwirkung von Zentrifugalkräften registriert wird. Dabei wird speziell eine lichtoptische Messung durch mehrere stufenweise radially angeordnete Photometer, Reflektometer bzw. Zeilendioden oder über ein radially bewegliches Photometer bzw. Reflektometer über der gesamten Meßkammer durchgeführt. Beim Verfahren nach EP 0194212 B1 findet eine Bestimmung von Oberflächenantigenen oder Strukturmerkmalen von Erythrozyten durch eine Agglutinationsreaktion unter Verwendung nichtmarkierter spezifischer Antikörper statt. Nur aufgrund der Eigenfarbe der Erythrozyten kann eine Ablesung des Sedimentationsverhaltens dieser Zellen erfolgen. Bestandteile ohne Eigenfarbe sind einer Untersuchung hierbei nicht zugänglich. Als Standardverfahren zur Erfassung von Oberflächenantigenen oder Strukturmerkmalen von Zellen, Partikeln oder Makromolekülen unter Verwendung fluoreszenzmarkierter Antikörper oder Liganden gilt die oben beschriebene Durchflußzytometrie. Trotz ihrer gut reproduzierbaren Ergebnisse ist die Durchflußzytometrie als ein technisch aufwendiges und kosten- und zeitintensives Verfahren einzustufen, welches immer nur die gleichzeitige Durchführung einer einzigen Analyse erlaubt. Bei einer größeren Analysenzahl werden rasch die Grenzen dieser Methode erreicht. Alle aufgeführten Verfahren zur Zentrifugalanalyse sind zur Erfassung von Oberflächenantigenen oder Strukturmerkmalen von Zellen, Partikeln oder Makromolekülen unter Verwendung spezifischer fluoreszenzmarkierter Antikörper oder Liganden nicht geeignet. In DE 4041554 C2 erfolgt zwar eine orts aufgelöste Transmissions- bzw. Reflexionsmessung in den Meßkammern von Küvetten, jedoch ist keine Aufschichtung der Bestandteile über ein flüssiges oder gelartiges Medium vorgesehen, sodaß auch keine bandenartige Auftrennung der Bestandteile erfolgt. Darüber hinaus ist in keinem der aufgeführten Verfahren zur Zentrifugalanalyse eine orts aufgelöste Messung der Fluoreszenzintensität vorgesehen. Letzteres setzt eine radially bewegliche Optik voraus, die eine punktförmige monochromatische Anregungsstrahlung erzeugt in einem fluoreszenzanregendem spektralem Bereich und einen Fluoreszenzdetektor beinhaltet, der auf den jeweiligen Anregungsort im Medium fokussiert ist und der über einen Emissionsmonochromator verfügt, der nur im spektralen Bereich des erzeugten Fluoreszenzlichts durchlässig ist, und die Wellenlänge des Anregungsstrahls unterdrückt.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren und eine Vorrichtung anzugeben, welches zur Erfassung von Oberflächenantigenen oder Struktur-

PCL XL error

Subsystem: IMAGE

Error: MissingData

Operator: ReadImage

Position: 568